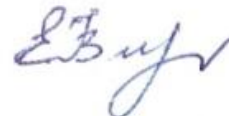


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

На правах рукописи



МАЛОФЕЕВА ЕКАТЕРИНА ВИКТОРОВНА

**Биохимические свойства транспортера ABCS10, принимающего
участие в формировании фенотипа множественной
лекарственной устойчивости**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре биохимии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

- Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент
Фаттахова Альфия Нурлимановна
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор
Каримова Фатима Габдуллазяновна (ФГБУН «Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук», заведующий секцией сигнальных систем)
- доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна (ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», профессор института фундаментальной медицины и биологии, отделения фундаментальной медицины, кафедры микробиологии)
- Ведущая организация** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «**Казанский государственный медицинский университет**» Минздрава России

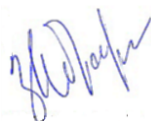
Защита диссертации состоится 26 сентября 2013 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, аудитория № 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КФУ к.104, отдел аттестации, ученому секретарю диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru

Ученый секретарь Диссертационного совета, доктор биологических наук



Абрамова З.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Одним из основных методов терапии злокачественных новообразований, по-прежнему, является химиотерапия с использованием противоопухолевых препаратов (Joensuu H. // *Lancet Oncol.* 2008. №9(3). P.304). Однако, применение этих средств, наряду с очевидными положительными эффектами, приводит к значительным нежелательным побочным эффектам. Высокая токсичность лекарственных средств диктует необходимость регулирования схемы и продолжительности лечения, что позволяет опухолевым клеткам вырабатывать механизмы резистентности и формировать фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) (Szakacs G. // *Nature Reviews. Drug Discovery.* 2006. № 9. P.219). Наиболее распространенным механизмом формирования МЛУ является АТФ-зависимый транспорт гидрофобных лекарственных препаратов с участием ABC-транспортеров, экспрессия которых повышена в опухолевых клетках (Gottesman M.M. // *Nature Reviews.* 2002. №2. P.48). Гиперэкспрессия ABC-транспортеров является одной из основных причин низкой эффективности современной химиотерапии. ABC-транспортеры способны выводить лекарственные вещества из клеток, способствуя развитию резистентности (Ullah M.F. // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2008. №9. P.1). В связи с этим основной задачей исследователей остается разработка высокоэффективных ингибиторов ABC-транспортеров. Однако, достигнутые в настоящее время результаты являются весьма скромными, поскольку известные противоопухолевые препараты обладают низкой эффективностью и тканеспецифичностью и зачастую являются субстратами нескольких обратных транспортеров (Deeley R.G. // *Physiol Rev.* 2006. №86. P. 849).

Хорошие результаты по ингибированию действия транспортеров ABCB1 и ABCC1 были получены в ходе доклинических исследований *in vivo* (Coley H.M. // *Methods Mol Biol.* 2010. №596. P. 341; Palmeira A. // *Curr Med Chem.* 2012. №19(13). P. 1946). Однако, в ходе работы было показано, что таксаны способны переноситься из клеток с помощью других обратных транспортеров. Чаще всего ингибирование одного из транспортеров приводит к

активации другого (Couture L. // Pharmacological Reviews. 2006. № 58(2). P. 244). Таким образом, происходит компенсация работы первого транспортера и нивелирование действия ингибитора. На сегодняшний день описаны неудачные результаты клинических исследований по модуляции и ингибированию активности белков множественной лекарственной устойчивости (Kolitz J.E. // Blood. 2010. № 116(9). P. 1413; Robey R.W. // Anticancer Agents Med Chem. 2010. № 10(8). P. 625). Причина подобных неудач может заключаться в отсутствии достаточных экспериментальных данных о биохимических свойствах белков семейства ABC в присутствии модуляторов.

В связи с вышеизложенным была поставлена **цель** – определить некоторые биохимические, структурные и транспортные свойства белка ABCC10 как представителя семейства белков множественной лекарственной устойчивости.

В соответствии с целью решались следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать АТФазную активность ABCC10. Изучить субстратную специфичность белка ABCC10. Выявить потенциальные ингибиторы ABCC10.
2. Определить локализацию ABCC10 в клетках с гиперэкспрессией ABCC10.
3. Изучить транспортные свойства белка ABCC10 с использованием клеток, гиперэкспрессирующих белок: провести сравнительный анализ накопления доцетаксела в клетках без и с гиперэкспрессией ABCC10; оценить трансэпителиальный транспорт веществ через плазматическую мембрану клеток.
4. Определить влияние мутаций в нуклеотид-связывающих доменах белка на АТФазную активность и транспорт субстратов ABCC10.

Научная новизна

В работе впервые исследованы биохимические свойства белка-транспортера ABCC10. Впервые было установлено, что ABCC10 локализуется в базолатеральной части плазматических мембран, участвует в переносе субстратов в направлении с апикальной на базолатеральную часть

мембраны. АТФазная природа белка АВСС10 была подтверждена методом автордиографии. Впервые были определены физиологические субстраты АВСС10, достоверно увеличивающие АТФазную активность белка, – лейкотриен С4, эстрадиол-глюкуронид и тамоксифен. Среди цитотоксических средств, увеличивающих АТФазную активность АВСС10, субстратами белка являются доцетаксел, паклитаксел и цитарабин. Были установлены ингибиторы активности АВСС10 – тирозинкиназный ингибитор сорафениб и природный алкалоид сефарентин, препятствующие транспорту доцетаксела из МЛУ клеток с гиперэкспрессией АВСС10. Впервые с помощью мутационного анализа установлена существенная роль нуклеотид-связывающих доменов в транспорте субстратов АВСС10.

Научно-практическая значимость работы

Полученные результаты представляют интерес в качестве методологической базы для скрининга веществ – потенциальных высокоэффективных и селективных ингибиторов АВСС10. Количественные результаты исследования представляют интерес в качестве справочных данных для таких областей науки, как биохимия, молекулярная фармакология, клеточная биология, медицина и могут быть использованы в учебном процессе на биологических, химических и медицинских факультетах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Белок АВСС10, вызывающий множественную лекарственную устойчивость, является АТФ-зависимым обратным транспортером, осуществляющим транспорт из клетки физиологических субстратов (лейкотриен С4, эстрадиол и тамоксифен) и противоопухолевых средств (таксаны и цитарабин).
2. Специфическими модуляторами активности АВСС10 являются тирозинкиназный ингибитор сорафениб и природный алкалоид сефарантин.

3. АТФазная активность и транспорт субстратов АВСС10 зависят от ароматических аминокислотных остатков, расположенных в нуклеотид-связывающих доменах белка АВСС10.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на следующих конференциях: III Международной научной онлайн конференции «Проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2012), III Международной научно-практической конференции «Постгеном» (2012); XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 2012); II Международной научной конференции «Современная биология: вопросы и ответы» (Санкт-Петербург, 2012); ежегодных научных конференциях студентов и аспирантов Научно-исследовательского центра рака «Фокс Чейз» (Филадельфия, США, 2011-2013); VIII Международной ежегодной АВСС конференции в северной Америке (Национальный институт здоровья США, Фредерик, США, 2011); IV Международной конференции «АВС-2012» (Инсбрук, Австрия, 2012); I Международной ежегодной биомедицинской научной конференции «Temple» (Филадельфия, США, 2012); Международной ежегодной конференции «AACR» (American Association for Cancer Research) (Вашингтон, США, 2013).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 1 статья в рецензируемом журнале из списка ВАК, а также 1 статья в международном журнале.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, включает 26 рисунков. Библиография включает 198 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали следующие модели: плазматические мембраны, выделенные из клеток *HiFive*, инфицированных АВСС10-содержащим бациловирусом, клетки с гиперэкспрессией АВСС10 (клетки колоректальной аденокарциномы человека *CaCo2* и эпителиальные клетки почек свиньи *LLC-PK1*), а также мутантные варианты АВСС10, полученные путем точечного мутагенеза и трансформированные в клетки *CaCo2* и *LLC-PK1*.

Выделение плазматических мембран клеток *HiFive*. Мембранную фракцию клеток *HiFive* с гиперэкспрессией АВСС10 и контрольных клеток получали путем гомогенизации клеток в буфере на основе 1×ФСБ (без Ca^{2+} , Mg^{2+}) (pH 7,5), содержащим 50 мМ трис-НСl, 50 мМ маннитола, 2 мМ EGTA, 0,2 % апротинина, 2 мМ DTT, 1 мМ AEBSF. Гомогенаты клеток подвергали поэтапному ультрацентрифугированию. Мембраны выделяли при 100000g и ресуспендировали в буфере на основе 1×ФСБ (без Ca^{2+} , Mg^{2+}) (pH 7,5), содержащим 10% глицерин, 50 мМ трис-НСl, 300 мМ маннитола, 1 мМ EGTA, 0,1 % апротинина, 1 мМ DTT, 0,5 мМ AEBSF, и в дальнейшем использовали для изучения АТФазной активности белка. Концентрацию белка определяли методом Шаффнера и Вейсмана. В качестве стандарта использовали концентрационную зависимость по БСА. После определения концентрации белка мембранную фракцию ресуспендировали до концентрации 1 мг/мл и хранили при -80°C.

Идентификация экспрессии белка АВСС10 методом Вестерн-блот. Для идентификации АВСС10 использовали Вестерн-блот анализ. Для этого проводили электрофоретическое разделение мембранной фракции в 3-8% NuPAGE геле (Invitrogen, США). После электрофоретического разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в трансфер-буфере при 4°C в течение ночи. После переноса мембрану окрашивали моноклональными антителами к АВСС10 в разведении 1:1000 или поликлональными антителами к АВСС10 в 1:3000. В качестве вторичных антител использовали мышиные антитела IgG и кроличьи антитела IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена,

соответственно. Инкубацию с антитела проводили в течение 10 мин, после каждого этапа мембрану промывали 4×45 мл ФСБ+Tween20 с использованием вакуумной системы SNAP I.D. После дополнительной отмывки 3×45 мл ФСБ регистрировали хемилюминесценцию. В качестве количественного маркера использовали антитела к β -актину в разведении 1:30000.

Определение АТФазной природы АВСС10. Тест на BeF-индуцированное связывание [α - 32 P]-8-азидоАТФ проводили с использованием АТФазного буфера, содержащего 0,5 мМ BeF, 2 мМ MgCl₂, 1 мг/мл АВСС10 мембран и 100 мкМ [α - 32 P]-8-азидоАТФ (2.5-10 мкКи/нмоль) (Affinity Photoprobes, LLC). Мембраны преинкубировали с буфером, не содержащим [α - 32 P]-8-азидоАТФ, в темной комнате в течение 3 минут, потом добавляли [α - 32 P]-8-азидоАТФ на 5 минут инкубации, затем в контрольных пробирках реакцию приостанавливали добавлением холодного АТФ (100 мМ). После инкубации реакцию останавливали облучением при 365 нм на льду в течение 10 минут. Затем пробы разделяли в ДСН-ПААГ геле, высушивали и проводили экспозицию на рентгеновскую пленку в течение 12-72 часов при -80°C.

Изучение АТФазной активности АВСС10. АТФазную активность выделенных плазматических мембран измеряли по высвобождению неорганического фосфата в реакции гидролиза АТФ. Специфическую активность АВСС10 определяли на фоне ортованадат- или BeFx-зависимой АТФазной активности. В 2×АТФазный буфер (100 мМ трис-НСl рН 7,5; 1М KCl; 0,25М азид натрия; 0,125 М EGTA; 1 мМ уабаин; 1М DTT) перед использованием добавляли 2М MgCl₂, затем вносили тестируемые вещества к 10 мкг мембранной фракции белка и выдерживали 5 мин при 37°C на водяной бане. В качестве контроля использовали BeF (BeSO₄ + NaF), который добавляли в контрольные пробирки для каждой группы экспериментов. Гидролиз проводили путем добавления 5 мМ АТФ, через 20 минут инкубации реакцию гидролиза останавливали введением 100 мкл 5% ДСН. В качестве коллометрического детектора использовали Pi-реагент (1 г молибдата аммония; 14 мг калия тартрата сурьмянокислого; 6,9 мл серной кислоты) в комбинации с 1% аскорбиновой кислотой. Количество неорганического фосфата измеряли после

20 минут инкубации с Pi-реагентом и аскорбиновой кислотой при 37°C на спектрофотометре при 880 нм. Кинетический анализ проводили по методу Лайнуивера-Берка с использованием программы GraphPadPrism 4.

Метод получения плазматических мембран опухолевых клеток *CaCo2* и *LLC-PK1*

Клеточные мембраны получали путем гомогенизации клеток с последующим центрифугированием гомогената. Гомогенизацию клеток проводили в РМ-буфере (1М HEPES, 1М MgCl₂, 1М KCl), содержащим протеазные ингибиторы: 5 мкг/мл апротинина, 5 мкг/мл лейпептина, 2 мкг/мл пепстатина, 100 мМ PMSF. Клеточные ядра и неразрушенные клетки устраняли центрифугированием при 500g в течение 10 минут при 4°C, затем супернатант центрифугировали при 3000g в течение 10 минут при 4°C. Клеточные мембраны отбирали центрифугированием супернатанта при 10000 g в течение 45 минут при 4°C, и осадок мембран ресуспендировали в РМ-буфере.

Определение чувствительности клеток *CaCo2* и *LLC-PK1* к доцетакселу

Чувствительность ABCC10 к доцетакселу анализировали в MTS-тесте (Promega, США). Контрольные *CaCo2-pcDNA3.1* и *LLC-pcDNA3.1*, а также *CaCo2-ABCC10*- и *LLC-ABCC10*-трансфицированные клетки рассеивали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^3 клеток/лунку (три повтора) в среде MEM. Далее клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C для их прикрепления ко дну лунки. На следующий день добавляли доцетаксел в различных концентрациях (0-800 нМ) и продолжали инкубацию в течение 72 часов. По окончании инкубации в каждую лунку добавляли MTS-реагент (бромистый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол) и инкубировали еще 4 часа. Далее измеряли оптическую плотность при 490 нм на спектрофотометре Biomate3 (ThermoScientific, США). Концентрации вещества, время инкубации и температура, используемые в эксперименте, подобраны экспериментально.

Методика измерения накопления [³H]доцетаксела в клетках

Контрольные *CaCo2-pcDNA 3.1/LLC-PK1-pcDNA 3.1* клетки и ABCC10-трансфицированные *CaCo2/LLC-PK1* клетки сажали в количестве 2×10^5 клеток на лунку в 6-луночном планшете. На следующий день среду заменяли на среду с

добавлением [^3H]-доцетаксела в конечной концентрации 0.1 мкМ (5 Ки/мМ). Далее клетки инкубировали в течение 15, 30, 60 и 90 минут при 37°C. С целью выявления воздействия ТК ингибиторов или других модуляторов на процесс накопления [^3H]-доцетаксела, клетки преинкубировали модуляторами в концентрации 2.5 мкМ в течение часа при 37°C. Далее среду заменяли на аналогичную, но с содержанием 0.1 мкМ [^3H]-доцетаксела, и проводили инкубацию с препаратом в течение 15, 30, 60 и 90 минут при 37°C. После инкубации клетки отмывали в холодном ФСБ и монослой клеток трипсинизировали с последующей инактивацией трипсина добавлением среды MEM, содержащей 10% БСА. Далее клетки осаждали центрифугированием с трехкратной отмывкой ФСБ при 500 g. Осадок клеток ресуспендировали в ФСБ. Внутриклеточную концентрацию [^3H]-доцетаксела измеряли на “LS6500 Multi-purpose Scintillation Counter”. Удельная радиоактивность рассчитывалась на 10^6 клеток. Все данные оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента с введением поправки Бонферрони, а $P < 0,05$ считали статистически достоверными (Акберова, 2003). Концентрации вещества, время инкубации и температура, используемые в эксперименте, подобраны экспериментально.

Исследование трансэпителиального транспорта веществ через плазматическую мембрану клеток *CaCo2* и *LLC-PK1*. Исследуемые клетки сажали на поликарбонатные мембранные фильтры-вставки в 24-луночные планшеты (3,0 мкм – размер пор, 6,5 мм вставка, Transwell 3415, Costar, США) в количестве 1×10^6 клеток на фильтр-вставку для *LLC-PK1* клеток и $1,5 \times 10^6$ клеток на фильтр-вставку для *CaCo2* клеток. Клетки росли в среде в течение 5-7 дней до момента конfluence, со сменой среды каждые два дня. В течение этого периода проводили измерение трансэпителиального электрического потенциала (TEER), используя эпителиальный вольтметр EVOM². Измерения проводили каждые два дня, и после достижения значения $\text{TEER} > 500 \text{ } \Omega\text{cm}^2$, начинали эксперимент. Монослой клеток, выросших на фильтре-вставке отмывали 3 раза HBSS (37°C), затем добавляли HBSS-буфер, содержащий 0,1 мкМ [^3H]-доцетаксела (5 Ки/мМ), либо в апикальную часть, либо в базолатеральную часть планшета со вставкой. Для изучения ингибиторных

свойств веществ, после этапа отмывки монослоя клеток, их преинкубировали с разведенными в HBSS-буфере веществами-модуляторами в течение 1 часа при 37°C. После этапа преинкубации с модуляторами, раствор HBSS удаляли и добавляли HBSS-буфер с веществом с тритиевой меткой в донорную часть вставки. Клетки инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂, затем отбирали 25 мкл аликвоты из каждой части вставки после 0, 2, 6, 12, 20 и 30 минут инкубации. Аликвоты растворяли в специализированном для измерения радиоактивности буфере и измеряли радиоактивность на “LS6500 Multi-purpose Scintillation Counter”.

Исследование локализации ABCC10 в клетках LLC-PK1 и CaCo2. Для определения локализации исследуемого белка ABCC10 использовали метод иммунофлуоресцентного анализа. Для этого LLC-PK1 и CaCo2 ABCC10-трансфектанты, и контрольные линии выращивали на покровных стеклах в течение трех дней до момента конfluence. После стекла промывали ФСБ и фиксировали в холодном метаноле в течение 10 минут. Далее клетки перфорировали в 1% Тритон-X100, затем блокировали 1х ФСБ буфером, содержащим 3% БСА, 0.1% Тритон-X100, и инкубировали с поликлональными микроличьями ABCC10 антителами (разведение 1:50 в блокирующем буфере) и с мышинным анти-β-катенином (разведение 1:500) в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали анти-крысиные, конъюгированные с Alexa-488, и анти-мышинные, конъюгированные с Alexa-568. Для покраски ядер использовали DAPI в разведении 1:2000. Локализацию ABCC10 регистрировали с использованием конфокальной микроскопии (Nikon Eclipse C1 Plus, Nikon, Япония).

Получение мутантных вариантов опухолевых клеток LLC-PK1 и CaCo2. ABCC10-pcDNA3.1 использовалась как основа для сайт-направленного мутагенеза по Tyr⁷⁴⁷, Tyr¹²⁵⁵ и Trp⁶⁰⁷, находящихся в нуклеотид-связывающихся доменах белка ABCC10. Мутагенез проводили с использованием QuickChange kit (Stratagene, США) по протоколу, описанному компанией, используя следующие праймеры (замененный нуклеотид подчеркнут): Y747C (5'-caggaaaaggagctct**G**tctctcgatgac-3'), Y1255C (5'-gtgttgcgct**G**ccggcca-3'), W607C

(5'– ttgttctcctgCgacccagttggaacc – 3'). Два праймера, используемые в ПЦР-реакции, являются комплементарными противоположным концам разных цепей ДНК. После проведения ПЦР и проверки всех мутаций путем рестрикции и секвенса, ABCC10 фрагменты, содержащие точечные мутации клонировали в pсDNA3.1 вектор. Далее пустой вектор, вектор ABCC10-pсDNA3.1 и вектор, содержащий мутантные варианты ABCC10 трансфецировали в *LLC-PK1* клетки с использованием Lipofectamine 2000. Индивидуальные колонии отбирали путем селекции в среде с повышенным содержанием гентамицина (1 мг/мл). Один клон от каждой мутации, в которых ABCC10 был выявлен путем вестерн-блот анализа, использовался в последующих экспериментах. Клетки проверяли каждые 3-6 месяцев на наличие микоплазмы, а также на экспрессию ABCC10 белка. После трансформации все клоны проверялись повторным секвенированием на наличие мутаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Биохимические особенности транспортера ABCC10 на модели плазматических мембран клеток *HiFive*, гиперэкспрессирующих ABCC10

1.1 Идентификация ABCC10, гиперэкспрессированного в клетках насекомых *HiFive*. Изучение природы ABCC10

Согласно результатам электрофоретического разделения белков и вестерн-блот анализа выявлена экспрессия белка (190 кДа) в плазматических мембранах клеток *HiFive*, инфицированных ABCC10-содержащим бацилловирусом (рис. 1А и В). Продукты деградации в образцах не выявлены.

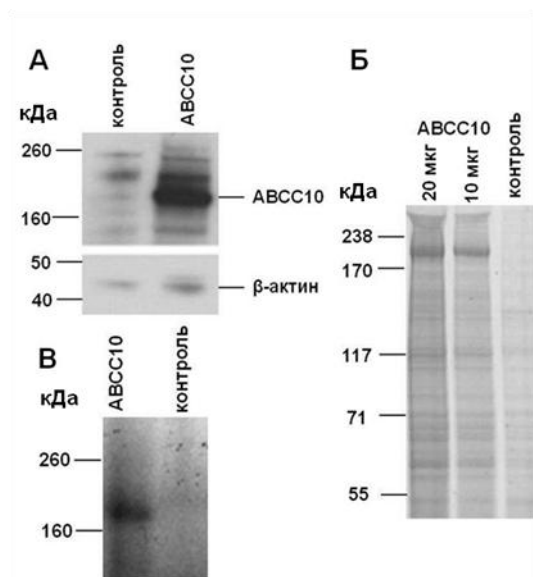


Рисунок 1 - Детектирование ABCC10-белка. А – Вестерн-блот анализ с анти-ABCC10 антителами с использованием мембранных белковых фракций, выделенных из клеток насекомых *HiFive*, инфицированных контрольным *pFastBac* ABCC10-не содержащим бацилловиром и ABCC10-содержащим бацилловиром. Б – идентификация ABCC10-белка с помощью окраски геля Кумасси, показывающая чистоту образца и отсутствие деградации белка. В – данные автордиографии по связыванию [32 P]-8азидоАТФ с ABCC10-белком плазматических мембран *HiFive* клеток.

Для доказательства того, что ABCC10-белок способен гидролизировать АТФ использовали радиоактивный нуклеотидный аналог [α - 32 P]-8-азидоАТФ. Результаты автордиографии демонстрируют связывание [α - 32 P]-8-азидоАТФ с белком ABCC10 плазматических мембран клеток *HiFive* (рис. 1В).

1.2 Основные особенности ABCC10-зависимого гидролиза АТФ

Для определения особенностей функционирования ABCC10, как обратного транспортера, определяли АТФазную активность изолированных мембран клеток *HiFive*.

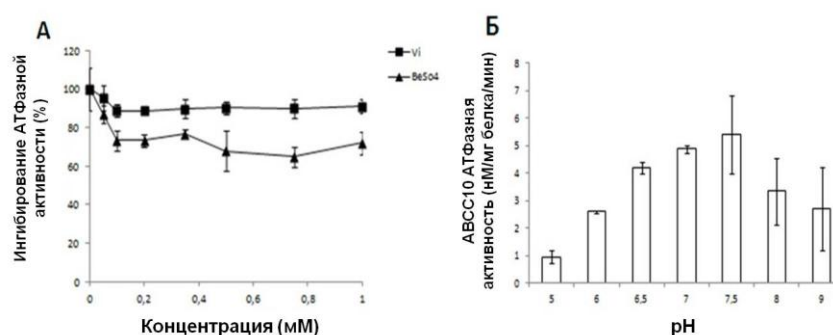


Рисунок 2 – ABCC10-зависимый гидролиз АТФ. А – АТФ гидролиз измеряли с использованием ABCC10-экспрессирующих мембран в присутствии ряда концентраций ВеF. Б – ABCC10 АТФазная активность при различных pH реакционной среды.

При концентрации ВеF 0,8 М ингибирование АТФазной активности ABCC10 достигает 32%, в случае использования ортованадата – 11,4% (рис. 2А). На рисунке 2Б показано, что оптимальная АТФазная активность ABCC10

достигается при pH 7,5. Оптимальная концентрация АТФ для АВСС10-зависимого гидролиза составляет 6 мМ (рис.3А).

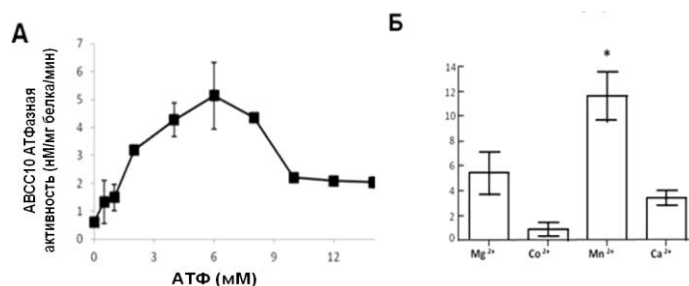


Рисунок 3 – АВСС10-зависимый гидролиз АТФ при различных концентрациях АТФ (А), дивалентных ионов в концентрации 2мМ (Б). Для каждого эксперимента результаты представлены как среднее значение от трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. * - статистически достоверное увеличение АТФазной активности АВСС10 в присутствии Mn^{2+} по сравнению с Mg^{2+} ($P=0,0178$).

Показано, что для белка АВСС10 АТФазная активность снижается в ряду $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+}$ (рис. 3Б).

Таким образом, максимальная АТФазная активность белка АВСС10 наблюдается при следующих условиях: pH 7-7.5; 6 мМ АТФ; наличие Mg^{2+} в качестве кофактора и фторида бериллия как ингибитора неспецифической АТФазной активности.

1.3 Индукция АТФазной активности АВСС10 в присутствии физиологических субстратов

В качестве физиологических субстратов были исследованы лейкотриен С4, эстрадиол-глюкуронид, тамоксифен и глутатион. Результаты влияния этих соединений на АТФазную активность АВСС10 приведены на рис.4.

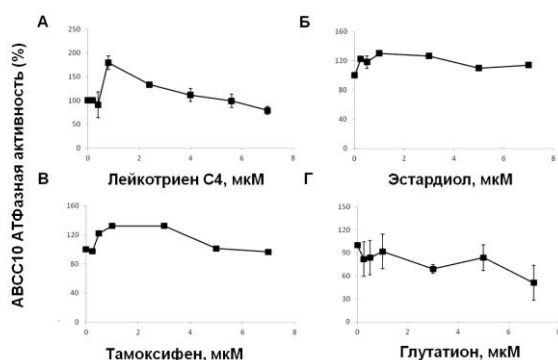


Рисунок 4 – Влияние лейкотриена С4 (А), эстрадиола (Б), тамоксифена (В) и глутатиона (Г) на АТФазную активность АВСС10. Для каждого эксперимента результаты представлены как среднее значение от трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

Лейкотриен С₄, эстрадиоли тамоксифен взаимодействуют с АВСС10, проявляя свойства субстратов АВСС10, а глутатион подавляет АВСС10 АТФазную активность.

1.4 Индукция АТФазной активности АВСС10 в присутствии противоопухолевых средств

Результаты по влиянию лекарственных средств на АТФазную активность АВСС10 приведены на рис. 5. АТФазная активность плазматических мембран клеток *HiFive* с контрольным вектором pFastBac не изменяется под действием анализируемых веществ (рис. 5А и Б).

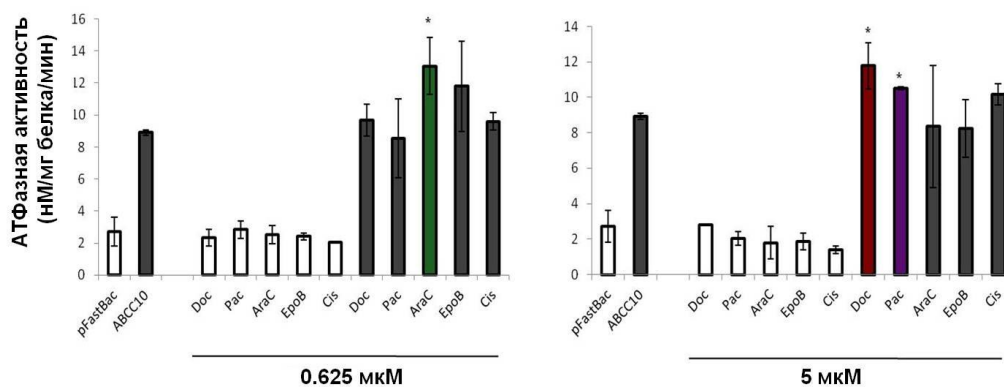


Рисунок 5 - Стимуляция АВСС10 АТФазной активности противоопухолевыми веществами. Обзор эффекта двух концентраций веществ на АТФазную активность: 0,625 мкМ (А) и 5 мкМ (Б). Данные эксперимента представлены средним значением трех независимых опытов ± стандартное отклонение. Достоверность различий между вариантами оценивали с помощью *t*-теста ($P \leq 0,05$). Сокращения: Doc - доцетаксел, Pac - паклитаксел, AraC - цитарабин, EtopB – эпитолон Б, Cis – цисплатин.

Аналогичная ситуация наблюдается и в случае плазматических мембран клеток *HiFive* с гиперэкспрессией АВСС10. Однако в этом случае обращает на себя внимание тот факт, что АТФазная активность зависит от концентрации противоопухолевых средств. Так, при использовании AraC в концентрации 0,625 мкМ, доцетаксела и паклитаксела в концентрациях 5 мкМ наблюдается статистически достоверное увеличение АВСС10 АТФазной активности на 32%, 15% и 24% соответственно.

2. Локализация и транспортные свойства белка-транспортера АВСС10

2.1 Экспрессия ABCC10-белка в эпителиальных LLC-PK1 и CaCo2 клетках

Для изучения локализации и экспрессии белка были получены поляризованные клетки с гиперэкспрессией ABCC10. Согласно результатам вестерн-блотанализа в образцах плазматических мембран, выделенных из клеток с ABCC10-содержащим вектором, экспрессия белка ABCC10 значительно превосходит таковую в образцах плазматических мембран клеток с пустым pcDNA 3.1 вектором (рис. 6 А и Б).

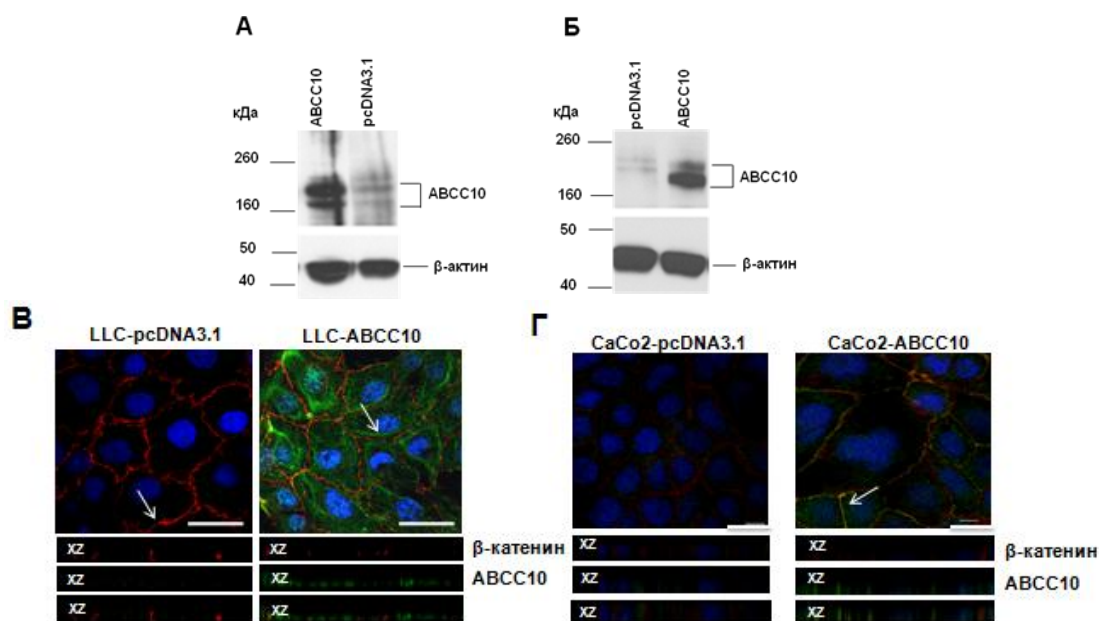


Рисунок 6 – Экспрессия ABCC10 в эпителиальных клетках LLC-PK1 (А) и CaCo2 (Б). В Вестерн-блот анализе использовали анти-ABCC10 антитела и анти-β-актин антитела. Локализация ABCC10 в поляризованных эпителиальных клеточных линиях LLC-PK1 (В) и CaCo2 (Г). В анализе использованы антитела к ABCC10 и к β-катенину (маркер базолатерального расположения в мембранах клеток). ABCC10 (зеленый), β-катенин (красный), окрашенная по DAPI ДНК (синий). Значение по шкале 20 мкм, увеличение 60х, XZ – 3D-срез.

Согласно результатам иммунофлуоресцентного анализа (рис. 6В и Г) ABCC10 преимущественно локализуется в плазматической мембране, но при этом обнаруживается и в цитоплазме клеток. Установить локализацию ABCC10 в контрольных клеточных линиях LLC-PK1(В) и CaCo2(Г)с пустым pcDNA 3.1 вектором не представляется возможным, поскольку в этом случае экспрессия ABCC10 не наблюдается.

2.2 Чувствительность LLC-PK1 и CaCo2 клеток к доцетакселу in vitro

Чувствительность клеток *CaCo2* и *LLC-PK1* к доцетакселу анализировали с помощью трехдневного MTS-теста. Установлено, что клетки *CaCo2-ABCC10* и *LLC-ABCC1* менее чувствительны к действию доцетаксела, чем контрольные клетки *CaCo2-pcDNA3.1* и *LLC-pcDNA3.1* (рис. 16). Полученные результаты свидетельствуют о том, что доцетаксел является субстратом обратного транспортера ABCC10.

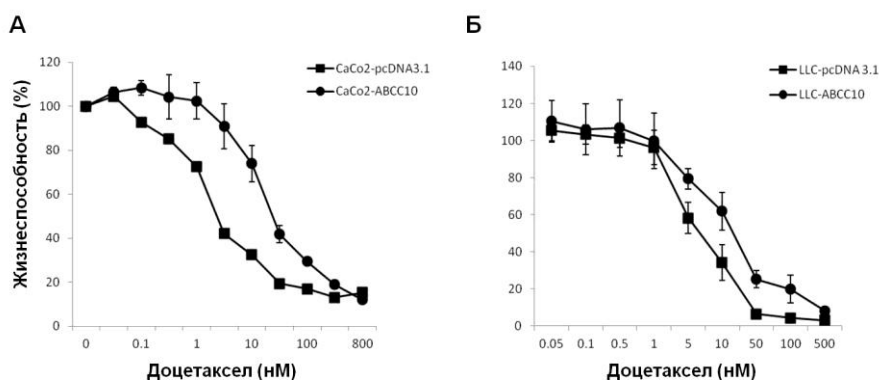


Рисунок 7 – Чувствительность контрольных линий клеток и трансфицированных *ABCC10* клеток к доцетакселу. А – *CaCo2*, Б – *LLC-PK1*. В эксперименте результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки использовался непараметрический *t*-тест, где значение $P < 0.05$.

2.3 Накопление и трансэпителиальный транспорт [^3H]-доцетаксела в эпителиальных поляризованных клеточных линиях без и с гиперэкспрессией *ABCC10*

Установлено, что при инкубации клеток *CaCo2-ABCC10* и *LLC-ABCC10* на фоне контрольных клеток внутриклеточная концентрация доцетаксела увеличивается в меньшей степени (рис. 8 А, Б).

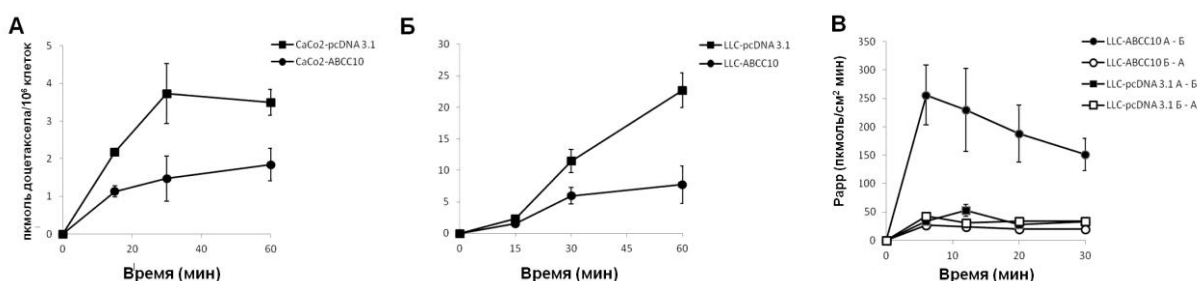


Рисунок 8 – Накопление [^3H]доцетаксела в поляризованных эпителиальных клетках *CaCo2* (А) и *LLC-PK1* (Б). Трансэпителиальный транспорт [^3H]доцетаксела в поляризованных *LLC-PK1* клетках (В). Данные эксперимента представлены средними значениями трех независимых опытов \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки использовался критерий Стьюдента для

множественных сравнений с введением поправки Бонферрони, $P \leq 0,05$. Сокращения: апикально-базолатеральный транспорт (А-Б), базолатерально-апикальный транспорт (Б-А).

Клетки *LLC-PK1* с гиперэкспрессией *ABCC10* транспортируют [^3H]-доцетаксел с апикальной на базолатеральную часть плазматической мембраны (рис. 8В). При этом контрольная клеточная линия, трансфицированная пустым *pcDNA3.1* вектором, не показала различия в транспорте как с апикальной на базолатеральную часть мембраны, так и в противоположном направлении. Апикально-базолатеральный транспорт [^3H]-доцетаксела клетками *LLC-ABCC10* был на 70-80% выше по сравнению с таковым для клеток *LLC-pcDNA3.1*.

2.4 Влияние модулирующих веществ на АТФазную активность *ABCC10*

Сефарентин, сорафениб, иматиниб, нилотиниб, эрлотиниб и лапатиниб в концентрации 5 мкМ являются эффективными ингибиторами гидролиза АТФ белка *ABCC10* (рис. 9).

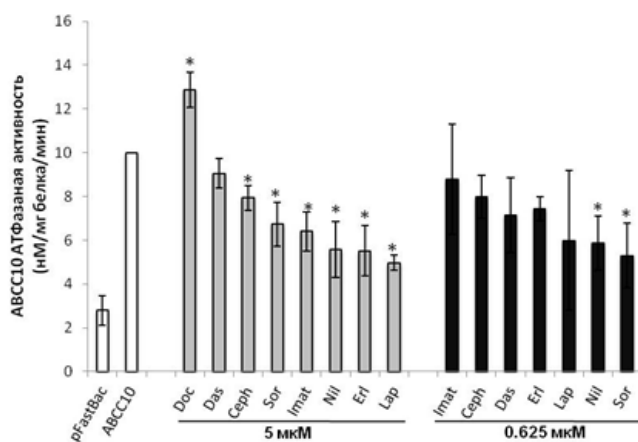


Рисунок 9 – Влияние модуляторов в концентрациях 0,625 мкМ и 5 мкМ на АТФазную активность *ABCC10*. В качестве модуляторов использовали: сефарентин (*Ceph*), сорафениб (*Sor*), дасатиниб (*Das*), иматиниб (*Imat*), нилотиниб (*Nil*), эрлотиниб (*Erl*), лапатиниб (*Lap*). Доцетаксел (*Doc*) использовали в качестве субстрата. Данные эксперимента представлены средними значениями трех независимых опытов \pm стандартное отклонение.

При понижении концентрации до 0,625 мкМ гидролиз АТФ ингибируют лишь нилотиниб (41%) и сорафениб (47%). Тирозинкиназный ингибитор дасатиниб при концентрациях 0,625 мкМ и 5 мкМ не проявляет свойств модулятора *ABCC10*.

2.5 Влияние модулирующих веществ на процесс накопления [^3H]-доцетаксела в эпителиальных *LLC-PK1* клетках

Для ТК ингибиторов использовали концентрацию 2,5 мкМ, а для природного алкалоида сефарентина – 5 мкМ. Практически все используемые модуляторы изряда ТК ингибиторов (нилотиниб, сорафениб, дасатиниб и эрлотиниб) и сефарентинувеличивают накопление [^3H]-доцетаксела в клетках с гиперэкспрессией ABCC10 (рис. 20). Поскольку некоторые из исследованных модуляторов (нилотиниб, дасатиниб и лапатиниб) оказывают действие и на контрольные клетки *LLC-pcDNA 3.1*, можно сделать вывод о неспецифическом относительно ABCC10 воздействии на транспорт доцетаксела. Мы полагаем, что механизм действия этих соединений обусловлен их воздействием на сигнальные пути, в которых участвуют тирозинкиназы.

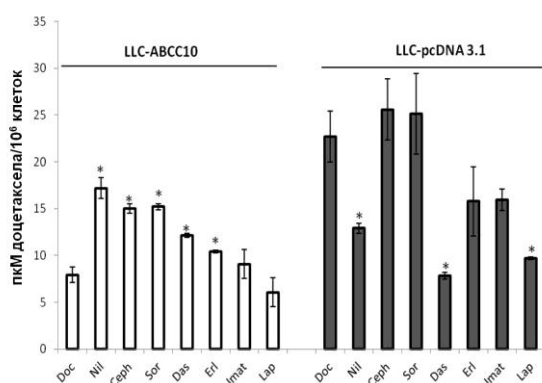


Рисунок 10 – Влияние модуляторов на клеточное накопление [^3H]-доцетаксела в эпителиальных LLC-PK1 клетках. Данные эксперимента представлены средними значениями трех независимых опытов \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки использовался критерий Стьюдента для множественный сравнений, $P \leq 0,05$.

Следует отметить, что в отличие от большинства исследованных модуляторов селективными являются лишь сорафениб и сефарентин, которые не оказывают воздействия на контрольную клеточную линию *LLC-pcDNA 3.1*, но достоверно увеличивают накопление доцетаксела в клетках с гиперэкспрессией ABCC10.

2.6 Влияние сефарентина и сорафениба на трансэпителиальный транспорт [^3H]-доцетаксела в поляризованных LLC-PK1 клетках

Сорафениб является потенциальным ингибитором транспорта доцетаксела в направлении от апикальной части на базолатеральную часть плазматической мембраны в клеточной линии *LLC-PK1* с гиперэкспрессией ABCC10 (рис. 11A). В контрольных клетках *LLC-pcDNA 3.1* сорафениб не оказывает влияния на транспорт доцетаксела (рис. 11B).

Аналогичная ситуация наблюдается и для сефарентина. При этом максимальное ингибирование апикально-базолатерального транспорта доцетаксела в клетках *LLC-ABCC10* наблюдается в интервале 6-20 минут после начала инкубации (рис. 11 В). Подобно сорафенибу, сефарентин не оказывает влияния на транспорт доцетаксела в контрольной клеточной линии (рис. 11 Г).

Таким образом, ингибиторами активности *ABCC10* являются природный алкалоид сефарентин и тирозинкиназный ингибитор сорафениб.

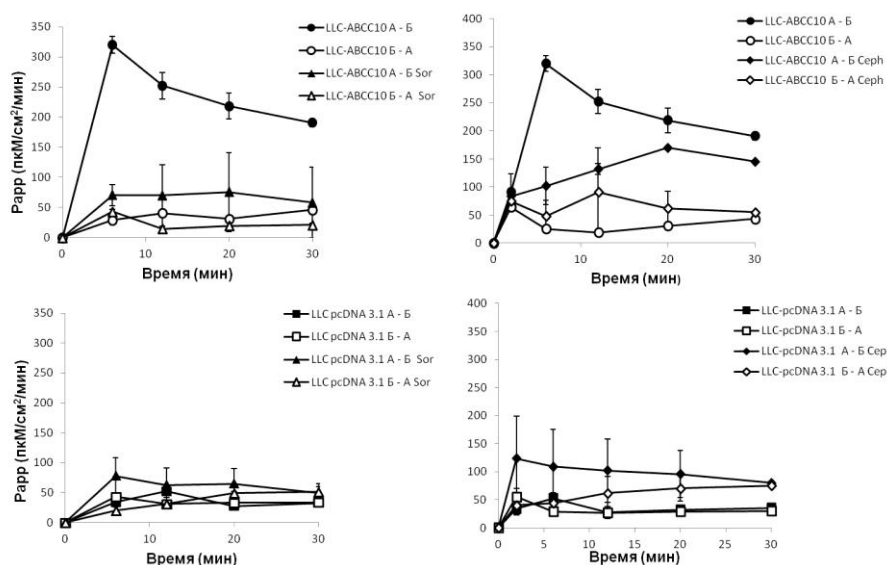


Рисунок 11 – Влияние модуляторов сорафениба (Sor) и сефарентина (Ceph) на трансэпителиальный транспорт $[^3H]$ доцетаксела в поляризованных клетках *LLC-ABCC10* (А, Б) и *LLC-pcDNA3.1* (В, Г). Данные эксперимента представлены средними значениями трех независимых опытов \pm стандартное отклонение. Сокращения: апикально-базолатеральный транспорт (А-Б), базолатерально-апикальный транспорт (Б-А).

3. Влияние мутаций по ароматическим аминокислотам в нуклеотид-связывающих доменах на АТФазную активность и транспорт субстратов *ABCC10*

3.1 Экспрессия *ABCC10*-белка в эпителиальных клетках, содержащих *ABCC10* с точечными мутациями ($W^{607}C$, $Y^{747}C$, $Y^{1255}C$) в нуклеотид-связывающих доменах

Для изучения влияния точечных мутаций по ароматическим аминокислотам (с заменой на цистеин) на транспортные и биохимические

свойства белка ABCC10 мутантные варианты ABCC10 были трансфицированы в эпителиальные *LLC-PK1* клетки. Иммуноблоттинг мембранной фракции, выделенной из клеточных линий, экспрессирующих мутантные варианты ABCC10, ABCC10 без мутации и контрольный pcDNA3.1 вектор, проводили с использованием моноклональных антител к ABCC10.

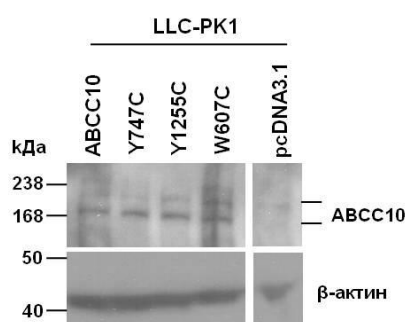


Рисунок 12 – Экспрессия ABCC10 в клеточной линии LLC-PK1, экспрессирующей ABCC10 без мутации, мутантные варианты ABCC10: Y747C, Y1255C, W607C, и контрольный pcDNA3.1 вектор. В вестерн-блот анализе использовали антитела против ABCC10 и антитела к β -актину, в качестве количественного контроля белковой нагрузки лунки.

Экспрессия мутантных вариантов ABCC10 несколько ниже в сравнении с экспрессией ABCC10 без мутаций. Таким образом, мутации в ABCC10 не оказывают значимого влияния на процессинг и стабильность белка.

3.2 АТФазная активность мутантных вариантов ABCC10, экспрессирующихся в LLC-PK1 клетках

При использовании таксанов (доцетаксела и паклитаксела) мутация Y1255C и W607C приводит к достоверному снижению АТФазной активности ABCC10. Однако мутация Y747C приводит к снижению АТФазной активности ABCC10 только при использовании паклитаксела. В случае использования AraC мутация Y1255C не оказывает достоверного эффекта, в то время как мутации W607C и Y747C приводят к увеличению АТФазной активности ABCC10.

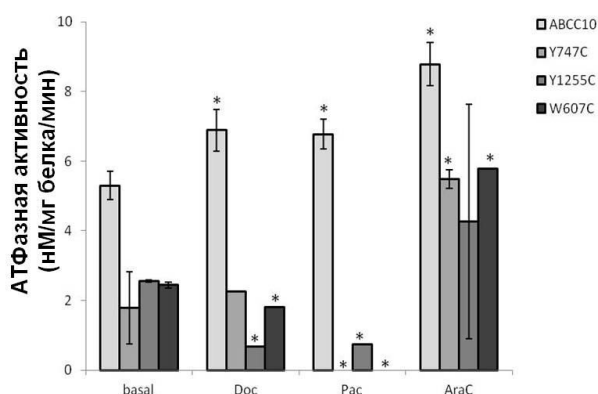


Рисунок 13 – АТФазная активность мутантных по ароматическим аминокислотам вариантов ABCC10 в присутствии различных субстратов ABCC10. Данные эксперимента представлены средними значениями трех независимых опытов \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки использовался критерий Стьюдента для множественных сравнений, $P \leq 0,05$. Сокращения: Doc - доцетаксел, Pac -

Таким образом, мутации Y1255C, W607C и Y747C в нуклеотид-связывающих доменах (НСД) приводят к изменению АТФазной активности АВСС10.

3.3 Влияние мутаций в нуклеотид-связывающих доменах АВСС10 на клеточное накопление [^3H]-меченых субстратов к АВСС10

Мутации W607C, Y1255C не влияют на накопление субстратов в сравнении с pcDNA3.1-экспрессирующими клетками. Однако, мутация Y747C достоверно понижает накопление субстратов в сравнении с pcDNA3.1-экспрессирующими клетками. На основе этих данных можно сделать вывод, что мутации W607C, Y1255C оказывают влияние на транспортные свойства АВСС10, способствуя накоплению субстратов в клетках.

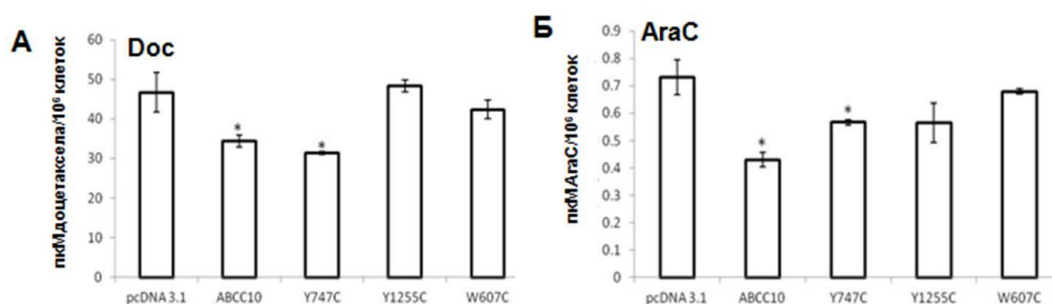


Рисунок 14 – Накопление [^3H]-меченных субстратов доцетаксела (А) и цитарабина (Б) в поляризованных эпителиальных клетках LLC-PK1 с гиперэкспрессией мутантных вариантов АВСС10. Данные эксперимента представлены средними значениями трех независимых опытов \pm стандартное отклонение.

3.4 Влияние мутаций в нуклеотид-связывающих доменах АВСС10 на трансэпителиальный транспорт [^3H]-меченых субстратов АВСС10 в поляризованных LLC-PK1 клетках

Установлено, что в трансэпителиальном транспорте [^3H]-доцетаксела участвует непосредственно ароматическая аминокислота в положении 1255 (тирозин). Замена на цистеин (мутация Y1255C) приводит к понижению транспорта [^3H]-доцетаксела.

В случае AraC в качестве ароматической аминокислоты, влияющей на транспорт, выступает триптофан в положении 607. Замена его на цистеин (мутация W607C) также, как и в случае мутации Y1255C, приводит к понижению апикально-базолатерального транспорта субстрата (рис. 15).

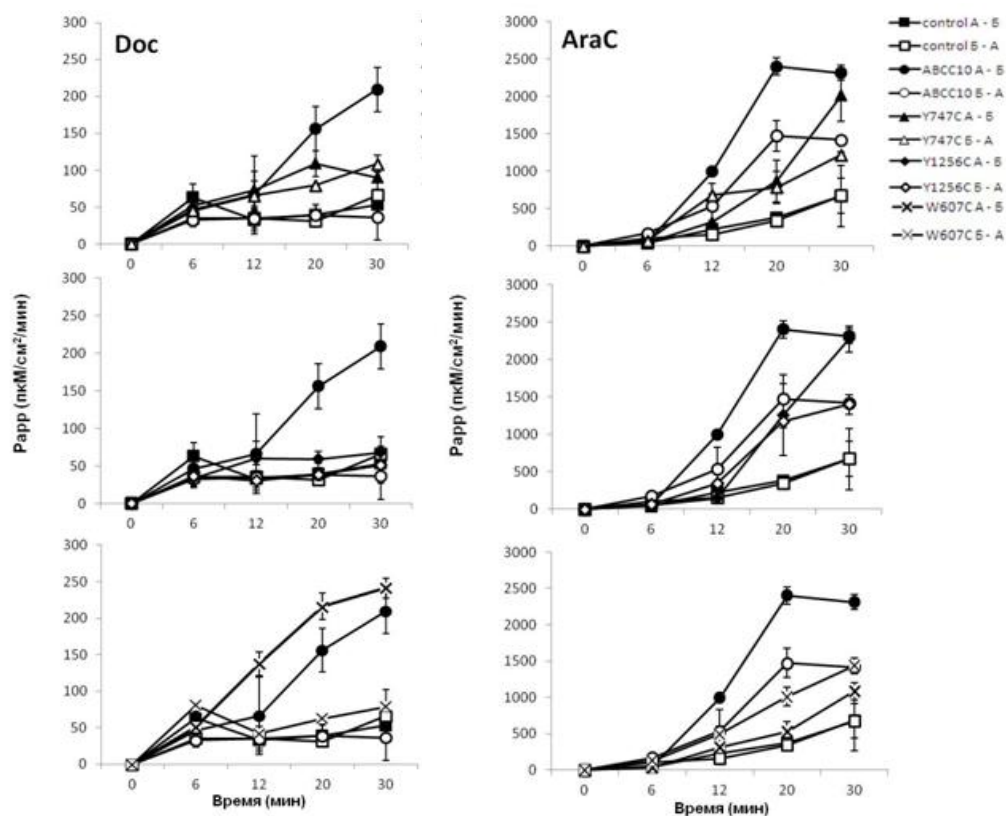


Рисунок 15 – Влияние W607C, Y747C, Y1255C мутаций на трансэпителиальный транспорт $[^3\text{H}]\text{AraC}$ в поляризованных клетках LLC-PK1. Графики сверху вниз: Y747C, Y1255C, W607C. Данные эксперимента представлены средними значениями трех независимых опытов \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки использовался критерий Стьюдента для множественных сравнений с введением поправки Бонферрони, $P \leq 0.05$.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что физиологическими субстратами АТФ-зависимого транспортера АВСС10 являются лейкотриен С4, эстрадиол и тамоксифен и противоопухолевые средства – таксаны и цитарабин.
2. АВСС10-белок локализуется в базолатеральной части плазматических мембран эпителиальных клеток и участвует в апикально-базолатеральном транспорте субстратов АВСС10.

3. Специфическими ингибиторами АТФазной активности и транспортных функций АВСС10-транспортера являются природный алкалоид сефарентин и тирозинкиназный ингибитор сорафениб.
4. Мутации *Y747C*, *W607C* и *Y1255C* приводят к снижению АТФазной активности АВСС10. Мутация *Y1255C* (замена тирозина на цистеин) приводит к снижению трансэпителиального транспорта доцетаксела, а мутация *W607C* (замена триптофана на цистеин) – АраС.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Малофеева, Е.В.** Анализ биохимических и транспортных свойств белка множественной лекарственной устойчивости MRP7 (ABCC10) на примере клеток *CaCo2* / Е. В. Малофеева, Н.В. Доманитская, А. Г. Иксанова, А. Н. Фаттахова и Е. Хоппер-Борж // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2013. – Т.156. – № 2. – С.9-18.
2. **Malofeeva, E.V.** Modulation of the ATPase and transport activities of broad-acting multidrug resistance factor ABCC10 (MRP7) / E.V. Malofeeva, N.V.Domanitskaya, M. Gudima, E.A. Hopper-Borge// Cancer Research. – 2012. – V. 72, №24. – P. 6457-6467.
3. **Малофеева, Е.В.** Мутации ароматических аминокислотных остатков в замене на полярные аминокислоты в нуклеотид-связывающих доменах приводят к изменению транспортных свойств АВСС10 / Е. В. Малофеева, Е. Hopper-Borge// AACR Annual Meeting 2013 – Вашингтон, США, 2013. – С. 874.
4. **Малофеева, Е.В.** Биохимическая активность и транспортные особенности АВСС10 транспортера, члена семейства АТФ-зависимых белков/ Е. В. Малофеева, Н.В. Доманитская, М. Гудима, Е.А. Hopper-Borge// ABC2012-4th FEBSS Special Meeting on ABC Proteins – Инсбрук, Австрия, 2012. – С. 115.
5. **Малофеева, Е.В.** Биохимическая активность и транспортные особенности АВСС10 транспортера, члена семейства АТФ-зависимых белков/ Е. В. Малофеева, Н.В. Доманитская, М. Гудима, Е.А. Hopper-Borge// 17th annual postdoctoral and graduate student research conference, Fox Chase Cancer Center – Филадельфия, США, 2012 – Р. 18.
6. **Малофеева, Е.В.** Эффект тирозинкиназных ингибиторов на биохимические особенности АВСС10 (MRP7) / Е.В. Малофеева, Hopper-Borge Е. // the First Annual Temple Biomedical Research Day – Филадельфия, США, 2012. – Р. 129.
7. **Малофеева, Е.В.** Анализ базальной АВСС10-зависимой активности/ Е. В. Малофеева, М. Гудима, Е.А. Hopper-Borge// 16th annual postdoctoral and

- graduate student research conference, Fox Chase Cancer Center - Филадельфия, США, 2011 – Р.30.
8. **Малофеева, Е.В.** Анализ биохимической активности и транспортных особенностей АВСС10 (представители семейства АТФ-зависимых белков) / Е.В. Малофеева, М.Гудима, S. Ambudkar, E.Hopper-Borge // 8th annual North American ABCC Genetic Workshop, National Cancer Institute – Фредерик, США, 2011. – Р. 22.
 9. **Малофеева, Е.В.** АТФ-зависимая активность мембранного транспортера, белка множественной лекарственной устойчивости АВСС10 (MRP7) / Е. В. Малофеева, А. Н. Фаттахова и Е. Hopper-Borge // Международная научная конференция “Современная биология: вопросы и ответы” – Санкт-Петербург, Россия, 2012. – С. 39.
 10. **Малофеева, Е.В.** Роль тирозинкиназных ингибиторов в АВСС10-зависимой множественной лекарственной устойчивости / Е. В. Малофеева, Н.В. Доманитская, А. Г. Иксанова, А. Н. Фаттахова и Е. Hopper-Borge // III Международная научная онлайн конференция “Проблемы в биохимии и бионанотехнологии” – Казань, Россия, 2012. – С. 196.
 11. **Малофеева, Е.В.** Роль тирозинкиназных ингибиторов в АВСС10-зависимой множественной лекарственной устойчивости / Е. В. Малофеева, Н.В. Доманитская, А. Г. Иксанова, А. Н. Фаттахова и Е. Hopper-Borge // “Постгеном 2012” – Казань, Россия, 2012. – С. 281.
 12. **Малофеева, Е.В.** АТФ-зависимая активность мембранного транспортера, белка множественной лекарственной устойчивости АВСС10 (MRP7) / Е. В. Малофеева, А. Н. Фаттахова и Е. Hopper-Borge // XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2012” – Москва, Россия, 2012. – С. 52.

Отзывы на автореферат просьба отправлять по адресу 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ, к.104, отдел аттестации научных кадров, Диссертационный совет Д 212.081.08, Ученому секретарю З.И. Абрамовой, факс: (843)238-76-01 E-mail: ziabramova@mail.ru